

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

STOMATOLOŠKI FAKULTET

Antonija Brezić

**ANTIBAKTERIJSKI UČINAK
MATERIJALA ZA PUNJENJE
KORIJENSKIH KANALA**

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2016.

Rad je ostvaren na Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju

Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu

Voditelj rada:

doc.dr.sc. Anja Baraba, dr.med.dent.

Zavod za endodonciju i restaurativnu stomatologiju

Stomatološki fakultet

Sveučilište u Zagrebu

Lektor hrvatskog jezika: Sanja Grgurević, prof. hrvatskog jezika i sociologije

Andrije Žaje 40, 10000 Zagreb // 0977705858

Lektor engleskog jezika: Ingrid Čeliković, prof. engleskog jezika i njemačkog jezika

Ulica braće Radića 66, 35252 Sibinj // 098213375

Rad sadrži:

- 44 stranice
- 10 tablica
- 4 slike
- 1 CD

ZAHVALA

Zahvaljujem se svojoj obitelji, prijateljima i dečku, koji su mi bili najveća podrška,
poticali me i vjerovali da ću dospjeti tu gdje danas jesam.

Zahvaljujem se svojoj mentorici, doc.dr.sc. Anji Barabi, na strpljivosti i pomoći pri
pisanju diplomskog rada te na iskazanoj susretljivosti tijekom svih godina studija.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. MATERIJALI ZA PUNJENJE KORIJENSKIH KANALA	2
1.1.1. Meka punila koja trajno ostaju meka (paste)	3
1.1.2. Meka punila koja se stvrdnjavaju u korijenskom kanalu (cementi).....	4
1.1.2.1. Punila temeljena na otapalu	4
1.1.2.2. Jodoform punila	4
1.1.2.3. Punila na bazi kalcij hidroksida	5
1.1.2.4. Cink-oksidi eugenol punila	5
1.1.2.5. Punila temeljena na smolama	5
1.1.2.6. Punila temeljena na staklenoionomerima	6
1.1.2.7. Punila temeljena na paraformaldehidu i kortikosteroidima.....	7
1.1.2.8. Punila temeljena na mineral trioksid agregatu.....	7
1.1.2.9. Punila temeljena na biokeramici	8
1.1.2.10. Punila temeljena na silikonima.....	9
1.1.3. Polutvrda punila	9
1.1.3.1. Gutaperka.....	9
1.1.3.2. Resilon	10
1.1.3.3. EndoRez štapići	10

1.1.4.	Tvrda punila	11
1.1.5.	Materijali za retrogradno punjenje	11
1.2.	ANTIBAKTERIJSKI UČINAK.....	12
1.2.1.	Test difuzije u agaru (ADT).....	12
1.2.2.	Test izravnog dodira (DCT)	14
1.2.3.	Test prodora bakterija u dentinske tubuluse.....	15
2.	SVRHA RADA.....	16
3.	MATERIJALI I POSTUPCI.....	17
4.	REZULTATI.....	21
4.1.	REZULTATI TESTA DIFUZIJE U AGARU (ADT)	21
4.2.	REZULTATI TESTA IZRAVNOG DODIRA (DCT)	22
5.	RASPRAVA	27
6.	ZAKLJUČAK	31
7.	SAŽETAK	32
8.	SUMMARY	33
9.	LITERATURA.....	35
10.	ŽIVOTOPIS	44

OZNAKE I KRATICE

MTA - mineral trioksid agregat

ADT - engl. Agar diffusion test – test difuzije u agaru

DCT - engl. Direct contact test – test izravnog dodira

CFU - engl. Colony forming units – jedinice koje tvore kolonije

VGS - engl. Viridans group Streptococci – grupa viridans streptokoka

1. UVOD

Mikroorganizmi i njihovi produkti najčešći su etiološki faktori u pulpnoj i periapikalnoj patologiji (1). Dobra mehanička obrada korijenskih kanala, uz kemijsku obradu sredstvima za ispiranje, važni su u uklanjanju nekrotičnog tkiva i eliminaciji bakterija, a time i za sam uspjeh endodontske terapije (2). Oblikovani i očišćeni korijenski kanali predstavljaju prostor u kojem su bakterije gotovo u potpunosti uklonjene ili im je barem smanjen broj i koje, posljedično tome, ne mogu više uzrokovati periapikalnu bolest (3,4). Kako bi se očuvalo takvo stanje, korijenske je kanale potrebno napuniti materijalima koji će trodimenzionalno zabrtviti cijeli endodontski prostor i spriječiti reinfekciju (5). Na taj će način materijali za punjenje korijenskih kanala spriječiti dolazak novih mikroorganizama, a onim preostalima uskratiti prehranu, prostor za razmnožavanje i odgovarajuće redoks uvjete za stvaranje značajnih biomasa pojedinih mikroba (6). Idealan materijal za punjenje morao bi osigurati potpuno brtvljenje endodontskog prostora, biti netoksičan, dimenzijski stabilan, biokompatibilan, jednostavan za rukovanje, ne resorbirati se te biti radioopaktn (7). Bakterije koje se nalaze na površini dentinskih tubula korijenskih kanala lako se odstranjuju mehaničkom obradom za razliku od onih koje su se nastanile u dubljim dijelovima dentinskih tubula. Zato je važno da, uz spomenuta svojstva, materijal posjeduje i antibakterijsko djelovanje kako bi aktivno (8) uništio preostale mikroorganizme (9) te spriječio njihov ponovni rast.

1.1. MATERIJALI ZA PUNJENJE KORIJENSKIH KANALA

Za punjenje korijenskih kanala mogu se rabiti različiti materijali koji se razlikuju po kemijskom sastavu i fizičko-mehaničkim svojstvima. Najčešće korišten materijal polutvrda je gutaperka, no ona sama kao takva nije dovoljna za dobro brtvljenje. Stoga se kanali, uz polutvrdo punjenje, pune i mekim punilom koje se stvrdnjava u korijenskom kanalu. Meko je punilo potrebno kako bi adheriralo na dentin te popunilo nepravilnosti i prostor između polutvrdog punila i korijenskog dentina (10).

Prema Grossmanu, poželjna svojstva materijala za punjenje korijenskih kanala su:

- mogućnost laganog unošenja u korijenski kanal
- brtvljenje korijenskog kanala lateralno i apikalno
- nemogućnost skupljanja materijala nakon unošenja u korijenski kanal
- neosjetljivost na vlagu
- bakteriostatska svojstva ili nepoticanje rasta bakterija
- radiokontrastnost
- ne uzrokuje obojenje tvrdih zubnih tkiva
- ne uzrokuje iritaciju periapikalnog tkiva
- sterilnost ili mogućnost sterilizacije prije unošenja
- lagano uklanjanje iz korijenskog kanala (7).

Materijali za punjenje korijenskih kanala mogu se podijeliti s obzirom na konzistenciju:

- meka punila koja trajno ostaju meka (paste)
- meka punila koja se stvrdnjavaju u korijenskom kanalu
- polutvrda punila
- tvrda punila
- materijali za retrogradno punjenje (11).

1.1.1. Meka punila koja trajno ostaju meka (paste)

Meka punila koja trajno ostaju meka jesu paste temeljene na kalcijevom hidroksidu koje se nakon određenog vremena resorbiraju pa se ne koriste za trajno punjenje korijenskih kanala. Kalcij hidroksid djeluje antimikrobno zbog visokog pH (12) te uništava staničnu stijenku bakterija i proteine (12). Koriste se u terapiji mladih trajnih zubi s nedovršenim rastom i razvojem korijena, u postupku apeksifikacije i apeksogeneze te za punjenje korijenova mliječnih zubi. Najpoznatiji preparati su: Calasept, Pulpodent, Calxyl i Calcipulpe.

1.1.2. Meka punila koja se stvrdnjavaju u korijenskom kanalu (cementi)

Cementi se u korijenski kanal unose u mekoj konzistenciji. Stvrdnjavaju se nakon određenog vremena.

1.1.2.1. Punila temeljena na otapalu

U punila temeljena na otapalu ubrajaju se kloroperka i eukaperka, a dobivene su otapanjem gutaperke u kloroformu, odnosno eukaliptolu. Stvrdnjavaju se hlađenjem otapala pa kao nedostatak imaju promjenu volumena i poroznost (11). Zbog kancerogenosti kloroforma, ova se punila ne preporučuju za uporabu te se ne rabe u kliničkoj praksi.

1.1.2.2. Jodoform punila

Jodoform punila jakog su antiseptičkog učinka, ali u slučaju prepunjenja izazivaju dugotrajnu iritaciju i bol sve dok se ne resorbiraju. Teško se uklanjaju iz korijenskog kanala pa se ne preporučuju kao sredstvo za punjenje (11).

1.1.2.3. Punila na bazi kalcij hidroksida

Punila na bazi kalcij hidroksida dvokomponentni su materijali sastavljeni od katalizatora (salicilatni ester) i baze (kalcijev hidroksid ili kalcijev oksid, kontrastno sredstvo, punilo, plastifikatori). Miješanjem baze i katalizatora materijal se stvrdnjava u kiseloj reakciji, stvarajući kalcij-salicilat kelator. Glavni predstavnici su: Sealapex, Apexit, CRCS - Calcibiotic root canal sealers i Biocalex (11).

1.1.2.4. Cink-oksidi eugenol punila

Cink-oksidi eugenol punila imaju antibakterijski učinak, ali se otapaju u tkivnim tekućinama i pokazala su toksičnost u kontaktu s vitalnim tkivima (13). Od preparata postoje: ProcoSol, Tubliseal, Hermetic (11).

1.1.2.5. Punila temeljena na smolama

U punila temeljena na smolama ubrajaju se poliketonske, epoksi i kompozitne smole.

Najpoznatiji predstavnik epoksi smole je AH Plus. Riječ je o proizvodu koji ima brže vrijeme stvrdnjavanja i bolju radiokontrastnost u odnosu na AH-26 silver free i AH-26 (14).

Kompozitne smole mogu se podijeliti na četiri generacije s obzirom na kronologiju njihove pojave na tržištu. Ako se kombiniraju s Resilon ili EndoREZ štapićima, stvaraju monoblok u korijenskom kanalu. Predstavnik prve generacije kompozitnih smola kao punila je Hydron. Riječ je o hidrofilnom materijalu koji je temeljen na poli-HEMA-i (15). Prve kompozitne smole pokazale su loša fizičko-mehanička svojstva te nisu bile biokompatibilne. Druga generacija kompozitnih smola (npr. EndoRez) također je bila hidrofilna i nije zahtijevala uporabu adhezijskih sustava (16). Treća generacija kompozitnih smola koristila se uz samojetkajuće adhezive, dok se u slučaju četvrte generacije adhezivi nisu morali primijeniti jer je sama kompozitna smola samoadhezivna (17).

1.1.2.6. Punila temeljena na staklenoionomerima

Staklenoionomerna su punila biokompatibilna i pokazuju odličnu adheziju na dentin. Međutim, kao važni nedostaci javljaju se mikropropuštanje i dezintegracija materijala (18, 19).

Jedan je od predstavnika Ketac Endo.

1.1.2.7. Punila temeljena na paraformaldehidu i kortikosteroidima

Punila temeljena na paraformaldehidu uzrokuju bezbolnu nekrozu. Ta su punila toksična i resorbiraju se iz korijenskog kanala. Njihova se uporaba u suvremenoj endodontskoj terapiji ne preporučuje. Neki pripravci sadrže kortikosteroide. Predstavnici su N2, Endomethasone, SPAD (11).

1.1.2.8. Punila temeljena na mineral trioksid agregatu

Mineral trioksid agregat (MTA) bioaktivni je materijal razvijen 90-ih godina 20. stoljeća. U početku se koristio kao materijal za zatvaranje perforacija zuba i retrogradno punjenje kaviteta (20).

MTA se na tržištu nalazi kao dvokomponentni sustav koji čine prašak i tekućina ili dvije paste. Osnovni sastav MTA-a čine dikalcij silikat, trikalcij silikat, bizmutov oksid, trikalcij aluminat i tetrakalcij aluminoforit (21). Hidrofilan je materijal i zahtijeva vlagu pri stvrdnjavanju. Kada se MTA nalazi u dodiru s dentinom, uz prisustvo fosfata, dovodi do stvaranja kristala hidroksiapatita (21). Tijekom njegova sazrijevanja, dolazi do precipitacije minerala i nastanka kemijske veze između dentina i MTA-a (22). Pasta na bazi MTA-a može se rabiti za punjenje korijenskih kanala. Biokompatibilna je (23), potiče diferencijaciju i migraciju odontoblasta (22) te remineralizaciju (23). Vezivanje MTA-a s dentinom omogućuje stvaranje biološke veze i time dobro brtvljenje. Visoki pH zaslužan je za blagu antimikrobnu aktivnost

(24). Velika se prednost MTA-a očituje u bržem cijeljenju periradikularnog područja uz ponovno stvaranje kosti i cementa, regeneraciji parodontnog ligamenta te nestanku upale (25).

1.1.2.9. Punila temeljena na biokeramici

Biokeramički materijali keramički su materijali posebno dizajnirani za korištenje u medicini i dentalnoj medicini. Ti su materijali temeljeni na aluminiju i cirkoniju, bioaktivnom staklu, staklokeramici, premazima i kompozitima, hidroksiapatitu i kalcij fosfatu (26, 27). Biokeramički su materijali biokompatibilni, netoksični, ne skupljaju se te su kemijski stabilni u biološkom okruženju (28). U slučaju prepunjenja korijenskog kanala i kontakta biokeramičkog materijala s tkivom, upalni se odgovor neće javiti (28). Daljnja prednost ovih materijala njihova je sposobnost formiranja kristala hidroksiapatita za vrijeme stvrdnjavanja, što u konačnici rezultira stvaranjem veze između dentina i materijala za punjenje (28). Visoki pH (12.8), koji omogućuje antibakterijski učinak, hidrofilnost i jednostavnost za korištenje te odlična sposobnost brtvljenja čine ih poželjnim materijalima za punjenje korijenskih kanala (28). Ti se materijali primjenjuju u implantologiji, parodontološkoj terapiji, augmentaciji kosti, maksilofacijalnoj kirurgiji, prekrivanju pulpe i apeksifikaciji (29).

1.1.2.10. Punila temeljena na silikonima

Punila temeljena na silikonima pokazala su biokompatibilnost (30). Njihova ekspanzija nakon stvrdnjavanja pridonosi boljem brtvljenju korijenskih kanala. Primjeri silikonskih punila su RoekoSeal i GuttaFlow.

1.1.3. Polutvrda punila

1.1.3.1. Gutaperka

Gutaperka je crvenkasti termoplastični materijal dobiven koagulacijom mliječnog soka drveta *Isonandra guttae* (11). Najčešće je rabljeni materijal za punjenje korijenskog kanala. Kemijski čista gutaperka postoji u dva jasno različita kristalna oblika – α i β gutaperka – koja mogu prelaziti jedan u drugi (31). Kolčići gutaperke koji se nalaze na tržištu β su faze gutaperke, dok se grijanjem na temperaturi 42 – 49 °C prevode u α fazu u kojoj se koriste u suvremenim termoplastičnim tehnikama punjenja. Gutaperka postoji i u amorfnom stanju u koje se može dovesti stalnim grijanjem gutaperke na 53 – 59 °C (11). Na tržištu gutaperku ne nalazimo u čistom obliku, nego uz dodatak cink oksida (1 dio gutaperke na 4-7 dijelova cink oksida), metalnog sulfata (radioopaker) te voska ili smole (plastifikator). Iako je čista gutaperka biološki inertan materijal, zbog dodatka cink oksida u kontaktu s periapikalnim tkivom može izazvati iritaciju. Gutaperka se otapa u kloroformu, eteru, ksilolu i eteričnim uljima (eukaliptusovo ulje). Na tržištu se može naći i uz dodatak jodoforma ili kalcij

hidroksida. Nedostaci su joj manjak adhezivnosti na zidove kanala te manjak čvrstoće (11).

1.1.3.2. Resilon

Resilon štapići sintetički su polimerni materijali koji sadrže bioaktivno staklo, bizmutov oksiklorid i barijev sulfat (32). Ti su štapići razvijeni kao zamjena za gutaperku te se koriste uz punilo temeljeno na kompozitnoj smoli. Kompozitno punilo s korijenskim dentinom i Resilon štapićima stvara kemijsku vezu, što omogućuje formiranje „monobloka“ (33).

1.1.3.3. EndoRez štapići

EndoRez štapići su štapići gutaperke prekriveni tankim slojem polibutadien-di-isocijano-metakrilata (34). Premaz na površini štapića gutaperke ima hidrofobni dio koji mu omogućuje kemijsku vezu s gutaperkom te površinski sloj koji omogućuje kemijsku vezu s kompozitnim cementima za punjenje korijenskih kanala (34).

1.1.4. Tvrdna punila

Tvrda punila danas se rijetko rabe za punjenje korijenskih kanala. Njihov je nedostatak krutost koja onemogućuje praćenje oblika korijenskog kanala što rezultira lošim brtvljenjem (11). U prošlosti su se rabili srebrni kolčići koji bi korodirali u kontaktu s vlažnim tkivom periapeksa, stoga se više ne koriste. Danas se eventualno rabe titanski i zlatni kolčići (11).

1.1.5. Materijali za retrogradno punjenje

Materijali za retrogradno punjenje moraju biti prilagođeni uvjetima rada u vlažnom mediju (11). Ti se materijali koriste u slučaju nemogućnosti ortogradnog endodontskog punjenja ili neuspjeha endodontskog liječenja kada se, nakon provedene apikotomije, izradi retrogradni kavitet. Od materijala za retrogradno punjenje rabe se dentalni amalgami bez cinka, staklenoionomerni cementi, materijali na bazi cink oksida kao što su IRM, Super EBA i Cavit (11), kompomeri, MTA, biokeramika, kalcij silikatni cementi te fosfatni keramički materijali. Iako postoje mnogobrojni materijali za retrogradno punjenje korijenskih kanala, nijedan ne osigurava njihovo idealno punjenje. Amalgam je nekad bio najčešće rabljeni materijal, no istraživanja su pokazala veće rubno propuštanje u odnosu na druge materijale (35), zbog nemogućnosti njegovog vezivanja za dentin (36).

1.2. ANTIBAKTERIJSKI UČINAK

Kako su bakterije i njihovi produkti najčešći etiološki uzročnici pulpnih i periapikalnih bolesti, glavni cilj endodontske terapije je ukloniti mikroorganizme iz korijenskih kanala kao i prevenirati reinfekciju (37). Međutim, mehanička obrada, ispiranje, korištenje antimikrobnih uložaka između posjeta te punjenje ne rezultiraju potpunom dezinfekcijom prostora korijenskih kanala (38), a bakterije su i dalje prisutne u dentinskim tubulima (39). Stoga antimikrobna aktivnost materijala za punjenje korijenskih kanala igra važnu ulogu u smanjenju ili sprečavanju rasta preostalih mikroorganizama te na taj način povećava uspjeh endodontskog liječenja. Izlažući mikroorganizme određenim koncentracijama antibakterijskog sredstva, može se ispitati njihova osjetljivost na isto. Za ispitivanje antibakterijskog djelovanja materijala za punjenje korijenskih kanala, obično se rabe test difuzije u agaru (ADT, engl. Agar diffusion test) i test izravnog dodira (DCT, engl. Direct contact test).

1.2.1. Test difuzije u agaru (ADT)

Test difuzije u agaru već se dugo koristi kao standardni test za ispitivanje antibakterijske aktivnosti dentalnih materijala (40). Riječ je o testu gdje se suspenzija odabranih bakterija postavlja na površinu ploče krvnih agara. Potom se izrežu mali zdenci s ploče agara koji se zatim popune punilom koje smo izabrali. Zona inhibicije mjeri se kao pokazatelj antibakterijskog učinka punila (41).

ADT omogućuje direktnu usporedbu materijala za punjenje korijenskih kanala protiv testiranih mikroorganizama, ukazujući koje punilo ima potencijal ukloniti bakterije. Relativno je neosjetljiva i semikvantitativna tehnika te ne razlikuje bakteriostatski učinak od baktericidnoga. ADT zahtijeva kontrolu i standardizaciju brojnih čimbenika kako bi se dobili ispravni rezultati. Brzina difuzije antimikrobnog sredstva ovisi o više varijabli: naboju i koncentraciji antimikrobnog sredstva u mediju, viskoznosti agara, temperaturi i ionskoj koncentraciji testiranog materijala (40, 42, 43). Kao važan čimbenik ističe se vrijeme koje mora biti dovoljno da antimikrobno sredstvo difundira u agaru, prije nego mikroorganizmi dosegnu određenu gustoću. Kako bi se dobili pouzdani i ponovljivi rezultati, potrebno je kontrolirati gustoću inokuluma (43). Važan je i odabir vrste medija, jer u slučaju odabira medija koji promiče sporiji rast mikroorganizama može doći do pogrešnog tumačenja antibakterijskog učinka sredstva. Debljina agara treba biti dovoljna da omogući glatku difuziju antimikrobnog sredstva, jer će preveliki ili premali volumen rezultirati lažno negativnim ili lažno pozitivnim rezultatima (43). Optimalna debljina agara je 4 mm (43, 44, 45), a optimalna temperatura je 37 °C. Odgađanje podizanja temperature usporit će rast mikroorganizama i stvoriti veću zonu inhibicije. Rezultati testa pod visokim su utjecajem topivosti i difuzije ispitnog sredstva kroz agar, stoga test nije prikladan za materijale netopive u vodi (41).

1.2.2. Test izravnog dodira (DCT)

Test izravnog dodira kvantitativni je test baziran na mjerenju brzine bakterijskog rasta za vrijeme bliskog i direktnog kontakta s materijalima koji se testiraju (46). Temelji se na mjerenju zamućenosti materijala za rast pomoću titarske ploče. Mikroploča se drži vertikalno i testirani materijal mora biti stavljen bez dodirivanja dna zdenca, inače postoji mogućnost dobivanja lažno pozitivnih rezultata.

DCT je neovisan o difuznim svojstvima testiranih materijala i medija te se ovim testom mogu ispitati i materijali koji nisu topivi u vodi. Omogućuje istodobno i standardizirano mjerenje velikog broja uzoraka i njihove kontrole na istoj titarskoj ploči te ima sposobnost pratiti rast mikroorganizama, u prisutnosti i odsutnosti testiranog materijala (47). Spomenuti test razlikuje bakteriostatsko od baktericidnog djelovanja.

1.2.3. Test prodora bakterija u dentinske tubuluse

Godine 1987. Haapasalo i Ostavik predložili su novu tehniku za testiranje infekcije i dezinfekcije dentinskih tubula (48). Za ovu se metodu mogu rabiti svježe izvađeni goveđi sjekutići. Nakon dezinfekcije 0,5%-tnim natrij hipokloritom (NaOCl), odsjeku se apikalni dio i dvije trećine krune pa se kanal proširi do 2 mm u promjeru. Potom se ukloni cement korijena, nakon čega ostaje cilindrični uzorak koji se zatim reže na dijelove od 4 mm. Blokovi dentina čuvaju se u sterilnoj vodi tijekom svih postupaka kako bi se izbjegla dehidracija. Zaostatni sloj uklanja se 17%-tnom EDTA-om, ultrazvučnom kupkom i 5,25%-tnim NaOCl-om kako bi se omogućilo otvaranje dentinskih tubula. Svi se dijelovi steriliziraju autoklaviranjem uzoraka u vodi 15 min na 121 °C. Zatim se dijelovi sele u bujon ekstrakta kvasca glukoze u kojem su inkubirani 24 sata kako bi se testirala njihova sterilnost. Određen broj presjeka izloži se bakterijama koje naseljavaju tubule tijekom 3 tjedna. Nakon postavljanja laka na vanjsku površinu, u kanale se postave testni materijali i ostave na određeno vremensko razdoblje. Po završetku istraživanja, testirani se materijal ukloni sterilnim svrdlom. Skupe se strugotine dentina i stavljaju se u moždano srčani bujon, u sterilne epruvete i inkubiraju tijekom određenog vremena. Optička gustoća bujona mjeri se spektrofotometrom za procjenu prisustva mikroorganizama i antibakterijskog učinka materijala. Umjesto goveđih, mogu se rabiti i humani zubi (8, 48, 49).

2. SVRHA RADA

Svrha ovog rada bila je ispitati antibakterijski učinak MTA, Endosequence, AH plus i Endo N2 materijala za punjenje korijenskih kanala.

3. MATERIJALI I POSTUPCI

Ispitan je antimikrobni učinak četiri punila za punjenje korijenskih kanala (slike 1-4), čiji je sastav prikazan u tablici 1, uporabom dva *in vitro* testa: testom difuzije u agaru (ADT) i testom izravnog dodira (DCT).

Tablica 1. Sastav ispitivanih materijala za punjenje korijenskih kanala.

Materijal	Sastav materijala
MTA (<i>Angelus</i> , Londrina, Brazil)	trikalcij silikat, trikalcij aluminat, dikalcij silikat, kalcij sulfat dihidrat, bizmutov oksid
ENDOSEQUENCE (<i>Braseller USA</i> , Savannah GA, SAD)	cirkonijev oksid, kalcijev silikat, monobazični kalcijev fostat, kalcijev hidroksid, punilo, plastifikatori
AH PLUS (<i>Dentsply</i> , York, Pennsylvania, SAD)	- <u>Pasta A</u> - diepoksid, kalcijev tungstat, cirkonijev oksid, silicijev dioksid, pigment - <u>Pasta B</u> - 1-adamantan amin N,N' - dibenzil-5-oksa-nonandiamin-1,9,TCD - diamin, kalcij tungstat, cirkonij oksid, silicijev dioksid, silikonsko ulje
ENDON2 (<i>Hager&Wergen</i> , Duisburg, Njemačka)	Prah - cinkov oksid, olovni tetraoksid, paraformaldehid, bizmutov subkarbonat, titanij dioksid, bismutov subnitrat, fenil-mercuri-borat Tekućina - eugenol, ulje



Slika 1. MTA



Slika 2. AH Plus



Slika 3. Endosequence



Slika 4. Endo N2

3.1. TEST DIFUZIJE U AGARU (ADT)

Testom difuzije u agaru određena je antimikrobna aktivnost ispitivanih materijala za punjenje na bakterije *Streptococcus mitis* i *Streptococcus oralis*.

Broj mikroorganizama bio je podešen na koncentraciju od približno 1×10^7 jedinica (McFarlandov Standard-bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francuska), što je potvrđeno bojanjem jedinica koje tvore kolonije (engl. Colony forming units - CFU) na krvnom agaru nakon 24-satne inkubacije na 37 °C.

Suspenzija svake bakterijske vrste, u koncentraciji približno oko 1×10^7 CFU/ml, bila je nanjena na površinu krvnog agara, razmazana sterilnim staklenim štapićem i puštena da se upije u podlogu tijekom 20 minuta. Svježe zamiješani materijali, prema uputama proizvođača, bili su nanjeni u količini od 0,01 g i promjera 6 mm u smjeru kazaljke na satu, na udaljenosti od oko 5 cm. Podloge su bile inkubirane na 37 °C tijekom 24 sata. Bio je mjeren promjer zone inhibicije rasta oko svakog materijala te su zabilježene vrijednosti izražene u milimetrima.

Test je izrađen u duplikatu i ponavljen je tri puta.

3.2. TEST IZRAVNOG DODIRA (DCT)

DCT je kvantitativna metoda kojom je određena antimikrobna aktivnost ispitivanih endodontskih materijala na *Streptococcus mitis* i *Streptococcus oralis*.

Suspenzije mikroorganizama pripremljene su u moždano-srčanom bujonu (BHI - *brain heart infusion*; Difco Laboratories, Detroit, MI, SAD) i inkubirane u rotoru na 37 °C tijekom 24 sata. Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana (3000 okr/min), supernatant odličen, a talog resuspendiran svježim 0,15 mol/l "*phosphate-buffered saline*" medijem (PBS; pH=6,9) te je u svim testovima rabljena koncentracija od oko 10^7 CFU/ml.

Svježe zamiješani materijali postavljeni su u zdence mikrotitracijske pločice s 96 zdenaca ravnog dna. Neposredno nakon toga, na materijal je dodano 10 µl mikrobne suspenzije i ostavljeno 1 sat na 37°C u vlažnoj atmosferi. Hlapljenjem tekućeg medija osigurao se bliski dodir između materijala i mikroorganizama. U svaki je zdenac potom dodano 250 µl BHI bujona te su uzorci inkubirani tijekom 1, 6, 20 i 24 sata. Pri završetku svakog vremenskog razdoblja napravljena su deseterostruka razrjeđenja, nasađena su na krvni agar te je sljedeći dan određen broj bakterijskih kolonija (CFU/ml). Prazni zdenci služili su kao pozitivna, a zdenci s materijalom (bez bakterijske suspenzije) kao negativna kontrola.

Test je rađen u duplikatu i ponavljen je tri puta.

4. REZULTATI

4.1. REZULTATI TESTA DIFUZIJE U AGARU (ADT)

U tablici 2 prikazane su širine zone inhibicije rasta ispitivanih mikroorganizama oko ispitivanih materijala. Najveći antibakterijski utjecaj na *Streptococcus mitis* imao je Endo N2, uz širinu zone inhibicije rasta od 15 mm, a na *Streptococcus oralis* Endosequence, uz širinu zone inhibicije rasta od 14 mm (tablica 2).

Tablica 2. Širine zone inhibicije rasta mikroorganizama oko ispitivanih materijala izražena u milimetrima.

MATERIJALI	MIKROORGANIZMI	
	<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
MTA	11	10
Endosequence	13	14
AH Plus	10	9
Endo N2	15	12

4.2. REZULTATI TESTA IZRAVNOG DODIRA (DCT)

U sljedećim je tablicama (tablice 3-10) prikazan utjecaj pojedinog materijala na broj bakterija tijekom četiri različita inkubacijska razdoblja. Najveći su antibakterijski utjecaj na *Streptococcus mitis* imali MTA i AH Plus, jer je nakon inkubacijskog razdoblja od 24h broj bakterija pod utjecajem MTA-a bio 1.512×10^7 (tablica 3), a pod utjecajem AH Plusa 1.45×10^6 (tablica 5). Najveći antibakterijski utjecaj na *Streptococcus oralis* imali su Endosequence i MTA. Nakon inkubacijskog razdoblja od 24h, broj bakterija *Streptococcus oralis* pod utjecajem materijala Endosequence bio je 1.23×10^5 (tablica 8), a pod utjecajem MTA-a 1.89×10^2 (tablica 7).

Tablica 3. Utjecaj materijala **MTA** na broj bakterija *Streptococcus mitis* tijekom različitih vremenskih razdoblja.

Vrijeme	Broj bakterija <i>Streptococcus mitis</i>
1H	1.285×10^7
6H	8.519×10^6
20H	1×10^6
24H	1.512×10^7

Tablica 4. Utjecaj materijala **Endosequence** na broj bakterija *Streptococcus mitis* tijekom različitih vremenskih razdoblja.

Vrijeme	Broj bakterija <i>Streptococcus mitis</i>
1H	3.25 x 10 ⑦
6H	2.4 x 10 ⑦
20H	1.54 x 10 ⑨
24H	2.7 x 10 ⑧

Tablica 5. Utjecaj materijala **AH Plus** na broj bakterija *Streptococcus mitis* tijekom različitih vremenskih razdoblja.

Vrijeme	Broj bakterija <i>Streptococcus mitis</i>
1H	1.45 x 10 ⑦
6H	1.4 x 10 ⑦
20H	1.65 x 10 ⑦
24H	1.45 x 10 ⑥

Tablica 6. Utjecaj materijala **Endo N2** na broj bakterija *Streptococcus mitis* tijekom različitih vremenskih razdoblja.

Vrijeme	Broj bakterija <i>Streptococcus mitis</i>
1H	2.016 x 10 ^⑦
6H	5.825 x 10 ^⑧
20H	5.983 x 10 ^⑧
24H	1.2 x 10 ^⑧

Tablica 7. Utjecaj materijala **MTA** na broj bakterija *Streptococcus oralis* tijekom različitih vremenskih razdoblja.

Vrijeme	Broj bakterija <i>Streptococcus oralis</i>
1H	7.573 x 10 ^②
6H	2.4 x 10 ^①
20H	1 x 10 ^①
24H	1.89 x 10 ^②

Tablica 8. Utjecaj materijala **Endosequence** na broj bakterija *Streptococcus oralis* tijekom različitih vremenskih razdoblja.

Vrijeme	Broj bakterija <i>Streptococcus oralis</i>
1H	3.5 x 10 ^⑦
6H	4.1 x 10 ^⑦
20H	1.4 x 10 ^⑤
24H	1.23 x 10 ^⑤

Tablica 9. Utjecaj materijala **AH Plus** na broj bakterija *Streptococcus oralis* tijekom različitih vremenskih razdoblja.

Vrijeme	Broj bakterija <i>Streptococcus oralis</i>
1H	1.6 x 10 ^⑦
6H	1.7 x 10 ^⑦
20H	1.883 x 10 ^⑧
24H	1.7 x 10 ^⑧

Tablica 10. Utjecaj materijala **Endo N2** na broj bakterija *Streptococcus oralis* tijekom različitih vremenskih razdoblja.

Vrijeme	Broj bakterija <i>Streptococcus oralis</i>
1H	2.55 x 10 ⑦
6H	2.4 x 10 ⑦
20H	2.54 x 10 ⑨
24H	24H 1.7 x 10 ⑧

5. RASPRAVA

U ovom su istraživanju korišteni test difuzije kroz agar i test izravnog dodira za ispitivanje antimikrobnog učinka MTA, Endosequence, AH Plus te Endo N2 materijala. Test difuzije kroz agar (ADT) jedna je od najčešće korištenih metoda za ispitivanje antimikrobne aktivnosti materijala za punjenje korijenskih kanala (50). Velika je prednost ove metode što omogućuje direktnu usporedbu antimikrobnog djelovanja materijala za punjenje korijenskih kanala na testirane mikroorganizme. Međutim, ovaj postupak ne ovisi samo o učinku materijala na testirani mikroorganizam, nego također može biti pod utjecajem difuzije i afiniteta prema materijalu u mediju za kulturu mikroorganizama, pa će materijal koji lakše difundira proizvesti veću zonu inhibicije bakterijskog rasta. Zbog spomenutog razloga ovaj test nije prikladan za materijale netopive u vodi (41). Kvantitativni test izravnog dodira (DCT), baziran na mjerenju brzine bakterijskog rasta za vrijeme bliskog i direktnog kontakta s materijalima koji se testiraju (46), praktički je neovisan o difuznim svojstvima testiranih materijala te omogućuje testiranje materijala koji nisu topivi u vodi. Oba su testa provedena na dvije različite bakterije: *Streptococcus oralis* i *Streptococcus mitis*. Spomenute bakterije pripadaju grupi viridans streptokoka (VGS). Iako je *Streptococcus mitis* dio normalne flore usne šupljine i smatra se da ima nisku virulenciju i patogenost, može uzrokovati životno ugrožavajuće infekcije, posebno endokarditis (51-53). Mogući je uzročnik sepse i septičkog šoka, posebno kod neutropeničnih pacijenata (52, 53). *Streptococcus oralis* sudjeluje u stvaranju zubnog biofilma koji je primarni etiološki čimbenik karijesa i parodontnih bolesti (54) te ima sposobnost prilagoditi se kiselim sredinama (55-57). Pretpostavlja se da različiti

proteini vezani za njihovu površinu imaju važnu ulogu u prilagodbi na kiselu okolinu (57), a takvi fiziološki mehanizmi mogu biti značajni za opstanak vrste. Uz potencijalni utjecaj na razvoj karijesnih lezija, *Streptococcus oralis* veže se i uz ekstraoralne bolesti, kao endokarditis i sepsu (57,58). Obje spomenute bakterije otpornije su na antibiotike od ostalih VGS (51, 59) te su upravo iz tog razloga pogodne za ispitivanje antimikrobnog učinka materijala za punjenje korijenskih kanala. Organizmi koji rastu u kiselim sredinama, kao streptokoki i laktobacili, pokazuju i sposobnost prilagodbe alkalnim promjenama. Ta se sposobnost zasniva na mehanizmu održavanja homeostaze između vanjskog i unutarstaničnog pH (60). Kako bi se postigla ta ravnoteža, prilagodba uključuje sintezu ekstracelularnih proteina i korištenje određenih intrizičnih mehanizama, kao što je proton pumpa (61) koja dopušta transport kationa i protona u tijelo stanice kako bi se pH citoplazme zadržao neutralnim (62-64). Strukturne komponente robusne bakterijske stijenke štite bakterije od štetnih čimbenika okoliša. Većina ovih mikroorganizama pokazuje brzo svojstvo prilagodbe kada su izloženi ekstremnim uvjetima.

Primjenom ADT-a, nakon 24-satne inkubacije materijala za punjenje korijenskog kanala, pokazalo se da Endo N2 stvara najširu zonu inhibicije rasta bakterije *Streptococcus mitis*, dok je u slučaju *Streptococcus oralis* najširu zonu inhibicije rasta stvorio Endosequence. Najslabiji učinak ADT-om na obje spomenute bakterije pokazao je AH Plus. Ovi su rezultati u skladu s drugim istraživanjima u kojima je Endo N2 pokazao odličan antibakterijski učinak, čak i bolji u usporedbi s AH Plus (65), dok je i Endosequence također pokazao dobar antibakterijski učinak (66, 67). Endo N2 jaki antibakterijski učinak duguje prisutnosti paraformaldehida.

Formaldehid inaktivira mikroorganizme alkiliranjem amino i sulfhidrilnih grupa proteina te atoma dušika prstena iz purinskih baza (68). On djeluje kao dezinficijens jer ubija većinu bakterija i gljivica (uključujući i spore). Kako je formaldehid plin, njegovo djelovanje nije posljedica samo direktnog kontakta, nego djeluje i na određenoj udaljenosti od točke nanošenja. Stoga Endo N2 posjeduje antimikrobni „učinak pare“ (69). Endosequence ima snažan antibakterijski učinak zbog visokog pH (12,9). Taj učinak nastaje kao posljedica razaranja membrane bakterijske stijenke i strukturnih proteina (70). Hidroksilni ioni induciraju lipidnu peroksidaciju, što rezultira destrukcijom fosfolipida, odnosno strukturne komponente stanične membrane bakterije (71, 72). Alkalizacija također potiče razgradnju ionske veze koja održava terciarnu strukturu proteina, što rezultira gubitkom biološke aktivnosti bakterijskih enzima i prekidom staničnog metabolizma te mogućim oštećenjem strukturnih proteina. Reagirajući s DNK-om, hidroksilni je ioni oštećuju i inhibiraju njezinu replikaciju te remete staničnu aktivnost (73). Ispitivanje osjetljivosti različitih mikroorganizama, različito inkubacijsko vrijeme, kao i primjena različitih metoda, neki su od čimbenika koji utječu na razlike u rezultatima različitih istraživanja. Istraživanje fakultativnih i striktnih anaeroba, pokazalo je da MTA ima antibakterijski učinak na neke fakultativne anaerobe, a nema učinka na striktne anaerobe (74). Drugo je istraživanje pokazalo antimikrobnu aktivnost MTA na *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* i *Enterococcus faecalis* (24). Različiti rezultati mogu se pripisati različitim vrstama mikroorganizama, različitim materijalima, kao i koncentraciji i vrsti MTA materijala korištenih u istraživanjima (75).

Za DCT rast mikroorganizama određen je za inkubacijska razdoblja od 1, 6, 20 i 24 sata. DCT-om za *Streptococcus mitis* AH Plus i MTA pokazali su se nešto djelotvornijim u odnosu na Endosequence i Endo N2, ali je broj bakterija i dalje bio značajan. Dobar antimikrobni učinak na *Streptococcus oralis* pokazao je MTA koji je, iako ne u potpunosti, znatno smanjio broj mikroorganizama. Iza MTA materijala po uspješnosti u eradikaciji *Streptococcus oralis* DCT-om slijedi Endosequence, čiji se učinak više istaknuo tek nakon 20 sati. U jednom je istraživanju Endosequence pokazao znatno slabiju antibakterijsku aktivnost nego AH Plus nakon 1 sata, dok su u drugim vremenskim intervalima oba materijala pokazala sličan antibakterijski učinak (67). AH plus i Endo N2 pokazali su DCT-om nešto slabiji antibakterijski učinak. Antibakterijska i antifugalna svojstva MTA-a izrazito su cijenjena, a prisutna su zbog oslobađanja hidroksilnih iona, čime se stvara antibakterijsko okruženje zbog visokog pH (76). Sličan mehanizam antibakterijskog djelovanja zbog visokog pH ima i Endosequence materijal.

6. ZAKLJUČAK

Unatoč mehaničkoj i kemijskoj obradi korijenskih kanala, istraživanja su pokazala velik broj bakterija koje zaostanu u dentinskim tubulima. Stoga je za punjenje korijenskih kanala potreban materijal koji ima antimikrobna svojstva kako bi se uklonile bakterije i spriječio njihov rast. Svi ispitivani materijali (MTA, Endosequence, AH Plus i Endo N2) pokazali su zadovoljavajući antimikrobni učinak testom difuzije u agaru, dok su najveću zonu inhibicije rasta ispitivanih bakterija pokazali Endosequence i Endo N2. Kod testa izravnog dodira za *Streptococcus mitis*, AH Plus i MTA pokazali su se djelotvornijim u usporedbi s Endosequence i Endo N2 materijalima, dok je najbolji antimikrobni učinak za *Streptococcus oralis* postignut s MTA-om.

7. SAŽETAK

Svrha istraživanja bila je ispitati antibakterijski učinak MTA, Endosequence, AH Plus i Endo N2 materijala za punjenje korijenskih kanala na bakterije *Streptococcus mitis* i *Streptococcus oralis*. Pri tome su korištena dva testa: test difuzije u agaru (ADT) i test izravnog dodira (DCT). Kod ADT-a suspenzija svake bakterijske vrste nanosena je na površinu krvnog agara, gdje su potom dodani materijali za punjenje korijenskih kanala. Nakon inkubacije od 24 sata, izmjerena je promjer zone inhibicije rasta oko svakog materijala. Kod DCT-a u zdenice su postavljeni materijali na koje su dodane mikrobne suspenzije. Nakon 1 sata, u svaki je zdenac dodano BHI bujona te su uzorci inkubirani tijekom 1, 6, 20 i 24 sata. Pri završetku svakog vremenskog razdoblja napravljena su razrjeđenja koja su nasadena na krvni agar te je sljedeći dan određen broj bakterijskih kolonija (CFU/ml). Najveći antibakterijski utjecaj na *Streptococcus mitis*, prema ADT-u, imao je Endo N2, uz širinu zone inhibicije rasta od 15 mm. Na *Streptococcus oralis* najveći je antibakterijski utjecaj imao Endosequence, uz širinu zone inhibicije rasta od 14 mm. DCT-om najveći je antibakterijski utjecaj na *Streptococcus mitis* pokazao AH Plus, gdje je nakon inkubacijskog razdoblja od 24 sata broj bakterija bio 1.45×10^6 . Najveći antibakterijski utjecaj na *Streptococcus oralis* imao je MTA, gdje je broj spomenutih bakterija nakon inkubacijskog razdoblja od 24 sata bio 1.89×10^6 . Najveću zonu inhibicije rasta ispitivanih bakterija pokazali su Endosequence i Endo N2. Kod DCT-a za *Streptococcus mitis*, AH Plus i MTA pokazali su se djelotvornijim u usporedbi s Endosequence i Endo N2 materijalima, dok je najbolji antimikrobni učinak za *Streptococcus oralis* postignut s MTA-om.

8. SUMMARY

ANTIBACTERIAL EFFECT OF ROOT CANAL FILLING MATERIALS

The aim of this study was to examine the antibacterial effect of MTA, Endosequence, AH Plus and Endo N2 root canal filling materials, on bacteria *Streptococcus mitis* and *Streptococcus oralis*. Therefore, two tests were used, the agar diffusion test (ADT) and the direct contact test (DCT). For ADT, a suspension of each bacteria was applied onto the surface of the blood agar plate. Then, the root canal filling materials were added. After 24h of incubation, the diameter of growth inhibition zone around each of the materials was measured. For DCT, materials were placed into the wells, onto which afterwards, microbial suspensions were added. After one hour, BHI broth was added into each of the wells. Subsequently, the samples were incubated for 1, 6, 20 and 24 hours. Then, dilutions, plated on blood agar, were made after each time period. The number of bacterial colonies (CFU/ml) was determined the next day. According to ADT, Endo N2 had the biggest antibacterial effect on *Streptococcus mitis*, with a zone width of 15 mm, while Endosequence had the best effect on *Streptococcus oralis*, with a zone width of 14 mm. For DCT, AH Plus had a major antibacterial effect on *Streptococcus mitis*, where, after 24h of incubation, the number of bacteria was 1.45×10^6 . As for *Streptococcus oralis*, the greatest antibacterial effect was caused by MTA, after the same time period, having a number of bacteria of 1.89×10^6 . Endosequence and Endo N2 displayed the biggest growth inhibition zone of the bacteria examined. For DCT, AH Plus and MTA were more efficient on

Streptococcus mitis compared to Endosequence and Endo N2, while MTA had the best antibacterial effect on *Streptococcus oralis*.

9. LITERATURA

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965 Sep;20:340–9.
2. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod.* 1992 Sep;18(9):427-30.
3. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics.* 2005 Mar;10(1):77–102.
4. Trope M, Bergenholtz G. Microbiological basis for endodontic treatment: can a maximal outcome be achieved in one visit? *Endod Topics.* 2002;1:40–53.
5. Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundquist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1997 Sep;30(5):297-306.
6. Whitworth J. Methods of filling root canals: principles and practices. *Endod Topics.* 2005 Nov;12(1):2–24.
7. Grossman L. *Endodontic Practice.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1981;10:279.
8. Saleh IM, Ruyter IE, Haapasalo M, Ørstavik D. Survival of *Enterococcus faecalis* in infected dentinal tubules after root canal filling with different root canal sealers in vitro. *Int Endod J.* 2004 Mar;37(3):193–8.
9. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one visit” endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005 Feb;99(2):231–52.

10. Kumar RV, Shruthi C. Evaluation of the sealing ability of resin cement used as a root canal sealer: An in vitro study. J Conserv Dent. 2012 Jul;15(3):274-7.
11. Zjača K, Prskalo K. Materijali za punjenje korijenskog kanala. Sonda. Dostupno na: <http://sonda.sfzg.hr/wp-content/uploads/2015/04/Zjača-K-et-al.-Materijali-za-punjenje-korijenskog-kanala.pdf>
12. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. Int Endod J. 2003 Feb;36(2):75–85.
13. Cohen S, Burns RC. Pathways of the dental pulp. Toronto: Mosby; 1984.
14. Torabinejad M, Walton ER. Endodoncija. Zagreb: Naklada Slap; 2009. p. 298-322.
15. Liu Q, Hedberg EL, Liu Z, Bahulekar R, Meszlenyi RK, Mikos AG. Preparation of macroporous poly(2-hydroxi-ethyl methacrylate) hydrogels by enhanced phase separation. Biomaterials. 2000 Nov;21(21):2163-9.
16. Kim YK, Grandini S, Ames JM, Gu L, Kim SK, Pashley DH, et al. Critical review on Methacrylate Resin-based Root Canal sealers. J Endod. 2010 Mar;36(3):383-99.
17. Radovic I, Monticelli F, Goracci C, Vulicevic ZR, Ferrari M. Self-adhesive resin cements: a literature review. J Adhes Dent. 2008 Aug;10(4):251-8.
18. Friedman S, Lost C, Zarrabian M, Trope M. Evaluation of success and failure after endodontic therapy using a glass ionomer cement sealer. J Endod. 1995 Jul;21(7):384-90.

19. Schafer E, Zandbiglari T. Solubility of root-canal sealers in water and artificial saliva. *Int Endod J*. 2003 Oct;36(10):660-9.
20. Lee SJ, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod*. 1993 Nov;19(11):541-4.
21. Manjusha R, Kavita V, Shweta S, Swapna M, Sheeba K. MTA-Root canal based sealers. *J Orofac Res*. 2013 Jan;3(1):16-21.
22. Han L, Okiji T. Uptake of calcium and silicon released from calcium silicate-based endodontic materials into root canal dentine. *Int Endod J*. 2011 Dec;44(12):1081-7.
23. Gomes-Filho JE, Watanabe S, Bernabé PF, de Moraes Costa MT. A mineral trioxide aggregate stimulated mineralization. *J Endod*. 2009 Feb;35(2):256-60.
24. Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. *In vitro* antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci*. 2007 Mar;49(1):41–5.
25. Schwartz RS, Mauger M, Clement DJ, Walker WA 3rd. Mineral Trioxide Aggregate: A new material for endodontics. *J Am Dent Assoc*. 1999 Jul;130(7):967–75.
26. Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: Past, Present and for the Future. *J Eur Ceram Soc* [Internet]. 2008 Feb;28:1319–1913. Dostupno na: http://eng.sut.ac.th/ceramic/old/course_link/88.pdf
27. Hench LL. Bioceramics: From Concept to Clinic. *J Am Ceram Soc* [Internet]. 1991 Apr;74(7):1487–1510. Dostupno na: http://www.ceramics.org/wp-content/uploads/2009/03/hench_bioceramics.pdf

28. Koch K, Brave D, Ali Nasseh A. A review of bioceramic technology in endodontics. C.E. article [Internet]. 2012;4. Dostupno na: http://www.dental-tribune.com/htdocs/uploads/printarchive/editions/60f01a2ff396414f6815530033a55bf8_6-12.pdf
29. Sakshi M, Mithra NH, Chitharanjan S. Bioceramic Technology in Endodontics. Br J Med Med Res. 2014Feb;4(12):2446-54.
30. Miletić I, Devčić N, Anić I, Borčić J, Karlović Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH Plus compared during different setting periods. J Endod. 2005 Apr;31(4):307-9.
31. Prakash R, Gopikrishna, Kandaswamy D. Gutta-Percha - An untold story. Department of Conservative Dentistry & Endodontics, Meenakshi Ammal Dental College. Dostupno na: <http://medind.nic.in/eaat/t05/i2/eaat05i2p32.pdf>
32. Miletić-Karlović I, Anić I. Punjenje korijenskog kanala resilon štapićima i epiphany punilom. Sonda. Dostupno na: https://www.sfzg.unizg.hr/_download/repository/resilon.pdf
33. Tay FR, Loushine RJ, Weller RN, Kimbrough WF, Pashley DH, Mak YF, et al. Ultrastructural evaluation of the apical seal in roots filled with a polycaprolactone-based root canal filling material. J Endod. 2005 Jul;31(7):514-9.
34. Pameijer CH, Zmener O. Resin Materials for Root Canal Obturation. Dent Clin North Am. 2010 Apr;54(2):325-44.
35. Johnson JR, Anderson RW, Pashley DH. Evaluation of the seal of various amalgam products used as root-end fillings. J Endod. 1995 Oct;21(10):505-8.

36. Friedman S. Retrograde approaches in endodontic therapy. *Endod Dent Traumatol.* 1991 Jun;7(3):97-107.
37. Pizzo G, Giammanco GM, Cumbo E, Nicolosi G, Gallina G. In vitro antibacterial activity of endodontic sealers. *J Dent.* 2006 Jan;34(1):35-40.
38. Abdulkader A, Duguid R, Saunders EM. The antimicrobial activity of endodontic sealers to anaerobic bacteria. *Int Endod J.* 1996 Jul;29(4):280-3.
39. Ørstavik D. Antibacterial properties of root canal sealers, cements and pastes. *Int Endod J.* 1981 May;14(2):125-33.
40. Tobias RS, Browne RM, Wilson CA. Antibacterial activity of dental restorative materials. *Int Endod J.* 1985 Jul;18(3):161-71.
41. Al-Shwaimi E. Evaluation of antimicrobial effect of root canal sealers. *Pak Oral Dental J.* [Internet]. 2011 Dec;31(2). Dostupno na: http://www.podj.com.pk/Dec_2011/47-Podj.pdf
42. Tobias R. Antibacterial properties of dental restorative materials: a review. *Int Endod J.* 1988 Mar;21(2):155-60.
43. Barry AL. Agar diffusion test: general considerations. The antimicrobial susceptibility test: principles and practices. Philadelphia: Lea and Febiger; 1976. p. 63-213.
44. Bary AL, Fay GD. The amount of agar in antimicrobial disk susceptibility test plates. *Am J Clin Pathol.* 1973 Feb;59(2):196-8.
45. Amorim Lde F, Toledo OA, Estrela CR, Decurcio Dde A, Estrela C. Antimicrobial analysis of different root canal filling pastes used in pediatric dentistry by two experimental methods. *Braz Dent J.* 2006;17(4):317-22.

46. Hegde MN, Hegde P, Shetty V, Sampath PB. Assessment of antibacterial activity of self-etching dental adhesive systems: An in vitro study. *J Conserv Dent*. 2008 Oct;11(4):150-3.
47. Weiss IE, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endod Dent Traumatol*. 1996 Aug;12(4):179-84.
48. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res*. 1987 Aug;66(8):1375-9.
49. Heling I, Chandler NP. The antimicrobial effect within dentinal tubules of four root canal sealers. *J Endod*. 1996 May;22(5):257-9.
50. Chong BS, Owadally ID, Pitt Ford TR, Wilson RF. Antibacterial activity of potential retrograde root filling materials. *Endod Dent Traumatol*. 1994 Apr;10(2):66-70.
51. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Tenenbaum BC. The Gram-positive cocci part II: streptococci, enterococci and the 'Streptococcus-like' bacteria. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 5th ed. New York: Lippincott; 1997. p. 577—649.
52. Lu HZ, Weng XH, Zhu B, Li H, Yin YK, Zhang YX, et al. Major outbreak of toxic shock-like syndrome caused by *Streptococcus mitis*. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul;41(7):3051—5.
53. Johnson CC, Tunkel AR. Viridans streptococci, groups C and G streptococci and *Gemella morbillorum*. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases*. 6th ed. New York: Churchill Livingstone; 2005. p. 2434—51.

54. Nyvad B, Kilian M. Comparison of the initial streptococcal microflora on dental enamel in caries-active and in caries-inactive individuals. *Caries Res.* 1990;24(4):267-72.
55. Takahashi N, Yamada T. Acid-induced acid tolerance and acidogenicity of non-mutants streptococci. *Oral Microbiol Immunol.* 1999 Feb;14(1):43–8.
56. Brailsford SR, Shah B, Simons D, Gilbert S, Clark D, Ines I, et al. The predominant aciduric microflora of root-caries lesions. *J Dent Res.* 2001 Sep;80(9):1828–33.
57. Wilkins JC, Beighton D, Homer KA. Effect of acidic pH on expression of surface-associated proteins of *Streptococcus oralis*. *Appl Environ Microbiol.* 2003 Sep;69(9):5290–6.
58. Beighton D, Carr AD, Oppenheim BA. Identification of viridans streptococci associated with bacteraemia in neutropenic cancer patients. *J Med Microbiol.* 1994 Mar;40(3):202-4.
59. Lyytikäinen O, Rautio M, Carlson P, Anttila VJ, Vuento R, Sarkkinen H, et al. Nosocomial bloodstream infections due to viridans streptococci in haematological and non-haematological patients: species distribution and antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2004 Apr;53(4):631-4.
60. Kroll RG. Alkalophiles. In: Edwards C, ed. *Microbiology of Extreme Environments*. Milton Keynes: Open University Press; 1990.p. 55–92.
61. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002 Mar;35(3):221–8.

62. Booth IR, Kroll RG. Regulation of cytoplasmic pH (pH_i) in bacteria and its relationship to metabolism. *Biochem Soc Trans.* 1983 Jan;11(1):70–2.
63. Booth IR. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiol Rev.* 1985 Dec;49(4):359–78.
64. Hall HK, Karem KL, Foster JW. Molecular responses of microbes to environmental pH stress. *Adv Microb Physiol.* 1995;37:229–72.
65. Gjorgievska E, Apostolska S, Dimkov A, Nicholson JW, Kaftandzieva A. Incorporation of antimicrobial agents can be used to enhance the antibacterial effect of endodontic sealers. *Dent Mater.* 2013 Mar;29(3):29-34.
66. Singh G, Gupta I, Elshamy FM, Boreak N, Homeida HE. In vitro comparison of antibacterial properties of bioceramic-based sealer, resin-based sealer and zinc oxide eugenol based sealer and two mineral trioxide aggregates. *Eur J Dent.* 2016 Jul-Sep;10(3):366-9.
67. Candeiro GT, Moura-Netto C, D'Almeida-Couto RS, et al. Cytotoxicity, genotoxicity and antibacterial effectiveness of a bioceramic endodontic sealer. *Int Endod J.* 2015 Aug.
68. Riviere JE, Papich MG. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics.* 9th ed. Iowa:Wiley-Blackwell; 2009.
69. Broisman H, van Houte J, Krakow AA. Antimicrobial effects of N₂ in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978 Jan;45(1):116-22.
70. Camões IC, Salles MR, Cheviatarese O, Gomes GC. Influence on pH of vehicle containing glycerin used with calcium hydroxide. *Dent Traumatol.* 2003 Jun;19(3):132-8.

71. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1987 Nov;1(5):358-64.
72. Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins Pathologic Basis of Disease. 6th ed. Philadelphia: Saunders; 1999.
73. Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science.* 1988 Jun 3;240(4857):1302-9.
74. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. *J Endod.* 1995 Aug;21(8):403-6.
75. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: A comprehensive literature review - part I: Chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):16–27.
76. Naik RM, Pudukalkatti PS, Hattarki SA. Can MTA be: Miracle trioxide aggregate? *J Indian Soc Periodontol.* 2014 Jan;18(1):5-8.

10. ŽIVOTOPIS

Antonija Brezić rođena je 8. ožujka 1992. godine u Slavonskom Brodu. Završila je Osnovnu školu „Ivan Mažuranić“ u Sibirju te srednju školu Klasičnu gimnaziju fra Marijana Lanosovića s pravom javnosti u Slavonskom Brodu. Godine 2010. godine upisuje Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu.